

METHOD FOR SEPARATING AND PURIFYING NUCLEIC ACID

Publication number: JP2005095003 (A)

Publication date: 2005-04-14

Inventor(s): KOMAZAWA HIROYUKI; IWAKI YOSHIHIDE; MAKINO YOSHIHIKO; AMANO YOSHIKAZU +

Applicant(s): FUJI PHOTO FILM CO LTD +

Classification:


- international: *G01N33/53; C12M1/00; C12N15/09; C12N15/10; C12Q1/68; G01N1/34; G01N37/00; B01L3/00; G01N33/53; C12M1/00; C12N15/09; C12N15/10; C12Q1/68; G01N1/34; G01N37/00; B01L3/00; (IPC1-7): C12N15/09; C12M1/00; C12Q1/68; G01N33/53; G01N37/00*


- European: *C12Q1/68A4; C12N15/10A3; C12Q1/68A4; C12Q1/68B10A; G01N1/34*

Application number: JP20030312147 20030904

Priority number(s): JP20030312147 20030904; JP20030311335 20030903

Also published as:

 EP1512741 (A2)

 EP1512741 (A3)

 US2005095626 (A1)

Abstract of JP 2005095003 (A)

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for extraction by which analysis of a nucleic acid can rapidly and simply be carried out in high purity and automation can be made in order to smoothly advance the analysis in an array method. ; **SOLUTION:** The nucleic acid separated and purified by the following method for separation and purification is analyzed by the array method. The method for separation and purification comprises a step of injecting a sample solution containing the nucleic acid into one opening of a cartridge for separating and purifying the nucleic acid passing the sample solution therethrough by a pressure difference and housing a nucleic acid adsorbing solid phase, discharging the sample solution containing the nucleic acid and injected into the cartridge for separating and purifying the nucleic acid in a pressurized state from the other opening of the cartridge for separating and purifying the nucleic acid and thereby adsorbing the nucleic acid in the interior of a nucleic acid adsorbing porous membrane, a step of injecting a wash liquid into the cartridge, passing the wash liquid through the porous membrane in the pressurized state and thereby washing the porous membrane in a state of the adsorbed nucleic acid and a step of then injecting a recovering liquid, passing the recovering liquid through the porous membrane, discharging the recovering liquid from the other opening, thereby desorbing the nucleic acid from the interior of the porous membrane and discharging the desorbed nucleic acid to the outside of the cartridge vessel for separating and purifying the nucleic acid. ; **COPYRIGHT:** (C)2005,JPO&NCIPI

.....
Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-95003

(P2005-95003A)

(43) 公開日 平成17年4月14日(2005. 4. 14)

(51) Int. Cl. ⁷		F I	テーマコード (参考)		
C 1 2 N	15/09	C 1 2 N	15/00	A	4 B O 2 4
C 1 2 M	1/00	C 1 2 M	1/00	A	4 B O 2 9
C 1 2 Q	1/68	C 1 2 Q	1/68	A	4 B O 6 3
GO 1 N	33/53	GO 1 N	33/53	M	
GO 1 N	37/00	GO 1 N	37/00	1 O 2	
審査請求 有 請求項の数 27 O L (全 16 頁)					
(21) 出願番号	特願2003-312147 (P2003-312147)	(71) 出願人	000005201		
(22) 出願日	平成15年9月4日 (2003. 9. 4)		富士写真フイルム株式会社		
(31) 優先権主張番号	特願2003-311335 (P2003-311335)		神奈川県南足柄市中沼2 1 O 番地		
(32) 優先日	平成15年9月3日 (2003. 9. 3)	(74) 代理人	100105647		
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		弁理士 小栗 昌平		
		(74) 代理人	100105474		
			弁理士 本多 弘徳		
		(74) 代理人	100108589		
			弁理士 市川 利光		
		(74) 代理人	100115107		
			弁理士 高松 猛		
		(74) 代理人	100090343		
			弁理士 濱田 百合子		
最終頁に続く					

(54) 【発明の名称】 核酸の分離精製方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】アレイ法において核酸解析を高精度に円滑に進めるために、高純度で迅速、簡便、かつ自動化できる抽出方法を提供する。

【解決手段】核酸を含む試料溶液を圧力差により溶液が通過可能な、核酸吸着性固相を収容した核酸分離精製力-トリッジの一の開口に注入し、核酸分離精製力-トリッジ内を加圧状態で注入した核酸を含む試料溶液を、核酸吸着性多孔膜を通過させ核酸分離精製力-トリッジの他の開口より排出することによって、核酸吸着性多孔膜内に核酸を吸着させる工程、当該力-トリッジに洗浄液を注入し、加圧状態で当該多孔膜を通過させることによって、核酸が吸着した状態で洗浄する工程、ついで回収液を注入して当該多孔膜を通過させ他の開口より排出することによって当該多孔膜内から核酸を脱着させ核酸分離精製力-トリッジ容器外に排出する工程、を含む分離精製方法によって分離精製した核酸を、アレイ法で解析することの特徴とする解析方法。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a)核酸を含む試料溶液を、少なくとも二つの開口を有する容器内に、圧力差により溶液が通過可能な、核酸吸着性固相を収容した核酸分離精製力 - トリッジの一の開口に注入する工程、 (b)核酸分離精製力 - トリッジの上記一の開口に結合された圧力差発生装置を用いて核酸分離精製力 - トリッジ内を加圧状態にし、注入した核酸を含む試料溶液を、核酸吸着性多孔膜を通過させ、核酸分離精製力 - トリッジの他の開口より排出することによって、核酸吸着性多孔膜内に核酸を吸着させる工程、 (c)核酸分離精製力 - トリッジの上記一の開口に洗浄液を注入する工程 (d)核酸分離精製力 - トリッジの上記一の開口に結合された圧力差発生装置を用いて核酸分離精製力 - トリッジ内を加圧状態にし、注入した洗浄液を、核酸吸着性多孔膜を通過させ、他の開口より排出することによって、核酸吸着性多孔膜を、核酸が吸着した状態で、洗浄する工程、(e)核酸分離精製力 - トリッジの上記一の開口に回収液を注入する工程 (f)核酸分離精製力 - トリッジの上記一の開口に結合された圧力差発生装置を用いて核酸分離精製力 - トリッジ内を加圧状態にし、注入した回収液を、核酸吸着性多孔膜を通過させ、他の開口より排出することによって、核酸吸着性多孔膜内から核酸を脱着させ、核酸分離精製力 - トリッジ容器外に排出する工程、を含む分離精製方法によって分離精製した核酸をアレイ法で解析することを特徴とする解析方法。

10

【請求項 2】

分離精製した核酸を核酸標識体とし、この核酸標識体を請求項 1 の核酸分離精製法で精製した後、アレイ法で解析することを特徴とする、請求項 1 に記載の解析方法。

20

【請求項 3】

核酸が DNA であり、PCR 法、ランダムプライム法を用いて標識した DNA をアレイ法で解析することを特徴とする、請求項 1 に記載の解析方法。

【請求項 4】

PCR 法、ランダムプライム法を用いて標識した DNA を請求項 1 の核酸分離方法で精製した DNA をアレイ法で解析することを特徴とする、請求項 3 に記載の解析方法。

【請求項 5】

核酸が DNA であり、PCR 法、ランダムプライム法を用いて DNA を合成し、次いでインビトロトランスレーションにより標識した RNA を合成し、該 RNA をアレイ法で解析することを特徴とする、請求項 1 に記載の解析方法。

30

【請求項 6】

PCR 法、ランダムプライム法を用いて合成した DNA を請求項 1 の核酸分離方法で精製するか、及び / 又はインビトロトランスレーションにより標識した RNA を請求項 1 の核酸分離方法で精製することを特徴とする、請求項 5 に記載の解析方法。

【請求項 7】

解析が、核酸配列の読み取り、又は一塩基多型の解析であることを特徴とする、請求項 1 から 6 の何れかに記載の解析方法。

【請求項 8】

核酸が RNA であり、逆転写反応法あるいは逆転写反応と PCR 法を用いて標識した DNA をアレイ法で解析することを特徴とする、請求項 1 に記載の解析方法。

40

【請求項 9】

核酸が RNA であり、逆転写反応法あるいは逆転写反応と PCR 法を用いて標識した DNA を請求項 1 の核酸分離方法で精製した DNA をアレイ法で解析することを特徴とする、請求項 1 に記載の解析方法。

【請求項 10】

核酸が RNA であり、逆転写反応法あるいは逆転写反応と PCR 法を用いて DNA を作成し、インビトロトランスレーションで標識した RNA をアレイ法で解析することを特徴とする、請求項 1 に記載の解析方法。

【請求項 11】

50

逆転写反応法あるいは逆転写反応とPCR法を用いて作成したDNAを請求項1の核酸分離方法で精製するか、及び/又は、インビトロトランスレーションで標識したRNAを請求項1の核酸分離方法で精製することを特徴とする、請求項10に記載の解析方法。

【請求項12】

解析が遺伝子発現解析であることを特徴とする、請求項8から11の何れかに記載の解析方法。

【請求項13】

核酸吸着性固相が、イオン結合が関与しない弱い相互作用で核酸が吸着することのできる有機高分子である、請求項1から12の何れかに記載の方法。

【請求項14】

核酸吸着性固相が、水酸基を有する有機高分子からなる多孔膜である、請求項1から13の何れかに記載の方法。

【請求項15】

水酸基を有する有機高分子からなる多孔膜が、アセチルセロ - スの多孔膜を鹼化処理した多孔膜である、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

水酸基を有する有機高分子からなる多孔膜がトリアセチルセロ - スの多孔膜を鹼化処理した多孔膜である、請求項14又は15に記載の方法。

【請求項17】

多孔膜が平均孔径0.1~10.0μmの多孔膜である、請求項14から16の何れかに記載の方法。

【請求項18】

多孔膜が厚さ50~500μmの多孔膜である、請求項14から17の何れかに記載の方法。

【請求項19】

核酸を含む試料溶液が、核酸の水溶液または核酸のバッファ溶液に水溶性有機溶媒を添加した溶液である、請求項1に記載の方法。

【請求項20】

核酸を含む試料溶液が、細胞又はウイルスを含む検体を核酸可溶化試薬で処理して得られた溶液に水溶性有機溶媒を添加した溶液である、請求項1に記載の方法。

【請求項21】

水溶性有機溶媒が、メタノール、エタノール、イソプロパノール又はn - プロパノールである、請求項19又は20に記載の方法

【請求項22】

核酸可溶化試薬が、グアニジン塩、および界面活性剤を含む溶液である、請求項20に記載の方法。

【請求項23】

洗浄液が、メタノール、エタノール、イソプロパノール又はn - プロパノールを20~100重量%含む溶液である、請求項1に記載の方法。

【請求項24】

回収液が、塩濃度が0.5M以下の溶液である、請求項1に記載の方法。

【請求項25】

圧力発生装置が、核酸分離精製カ - トリッジの一の開口に着脱可能に結合されるポンプである請求項1に記載の核酸分離精製方法。

【請求項26】

請求項1~12に記載の、核酸分離精製工程に続いてアレイ法による核酸の検出を行うための装置。

【請求項27】

請求項1~12に記載の、核酸分離精製工程に続いてアレイ法による核酸の検出を行うための試薬キット。

10

20

30

40

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、迅速、簡便に核酸を分離精製してアレイ法に用いることに関する。より詳細には、本発明は、少なくとも二個の開口を有する容器内に核酸吸着性固相を収容した核酸分離精製力-トリッジと圧力発生装置を用いて、核酸を含む検体から核酸の分離精製を行い、アレイ法に用いることに関する。

【背景技術】

【0002】

核酸を含有する試料から核酸を得る方法としては、フェノール・クロロホルム法が古くから利用されている。この方法はフェノール・クロロホルムを用いてタンパク質、脂質等の水難溶性検体成分を変性、溶解、または沈澱させ、核酸を水相に溶解する溶解度の違いを利用する。しかしながらこの方法は、有毒な有機溶媒を使用すること、煩雑な操作を必要とするため抽出される核酸の精製度が実験者の腕に委ねられること等の問題を有している。

【0003】

また、広く知られた精製方法の一つに、核酸を二酸化珪素、シリカポリマー、珪酸マグネシウム等の固相に吸着させ、引き続き洗浄、脱着等の操作によって精製する方法がある（例えば、特公平7-51065号公報）。この方法は、分離性能としては優れているが、簡便性、迅速性、自動化適性においては十分でなく、同一性能の吸着媒体の工業的大量生産が困難であり、種々の形状に加工しづらい、また吸着液に腐食性のカオトロピックイオンをしばしば用いるために取扱いが不便等の問題点がある。

【0004】

そこで、核酸抽出および精製に関しては、高純度核酸を迅速、簡便、かつ自動化できる方法で核酸を含む試料から単離できる手段が望まれている。

【0005】

また、このような抽出精製された核酸は、ポリメラーゼ連鎖反応や制限酵素で消化するといった酵素反応や、サザンハイブリダイゼーションやノーザンハイブリダイゼーションといった核酸解析に用いられる。そのなかでも、近年、一度に大量に遺伝子情報を得ることが出来るDNAマイクロアレイ法に代表されるアレイ法が注目されている。

【0006】

DNAマイクロアレイ法の開発は、1980年代後半のヒトゲノム計画の開始とともに、大量の塩基配列の高速解析が要求されるようになったことに端を発する。新しい原理に基づいたシーケンシング法の1つとして、Drmanacらによって、DNAがマトリックス状に並べられた基板上で、複数のハイブリダイゼーション反応を並行して行い、それによって得られるハイブリダイゼーションシグナルを解析することで、DNA塩基配列を知るというSBH法（Sequence By Hybridisation：米国特許第5202231号）が提唱され、これがDNAマイクロアレイ開発の契機となった。

【0007】

その後、Southernらにより、基板上にオリゴヌクレオチドを直接合成し、これを遺伝子の機能解析に用いることが可能であることが示された（米国特許第5700637号）。さらに、SBH法を発展させ、高密度オリゴヌクレオチドアレイDNAの作成方法がFodorらにより開発された。これは、光照射で選択的に除去される保護基を使用し、半導体製造に用いられるフォトリソグラフィ技術と固相合成技術を利用して、固相担体上の多数の微小なマトリックスで、組合せ反応（コンビナトリアル・シンセシス）により、多種類のオリゴヌクレオチドを同時に合成する方法である（Fodor, S. P. A. et al, Science, 251, 767-773(1991)）。

【0008】

この方法は、現在では、遺伝子の発現、変異、多型等を短時間で効率よく調べることが可能である「Gene Chip」として、市販されている。

【0009】

その他のDNAマイクロアレイを作製する方法として、「スタンフォード方式」として知られる予め調製したDNA断片を固相担体表面に固定する方法などがある。この方法は、予め調製したDNA断片試料などのプローブ材料を固相担体表面に点着させることにより共有結合あるいはイオン結合を利用して結合固定する方法であり、プローブ材料の種類や固相担体の種類に応じて下記のように分類することができる。

【0010】

(1) 固相担体に固定するプローブ分子がcDNA(mRNAを鋳型にして合成した相補的DNA)あるいはPCR産物(cDNAをPCR法によって増幅させたDNA断片)などのDNA断片試料である場合には一般に、これらをDNAマイクロアレイ作製装置に備えられたスポット装置を用いて、ポリ陽イオン(ポリリシン、ポリエチレンジイミン等)で表面処理した固相担体表面に点着し、DNA断片試料の荷電を利用して固相担体に静電結合させて固定する(Schena, M et al, Science, 270, 467-470(1995))。

10

【0011】

(2) 固定するプローブ材料が合成物(オリゴヌクレオチド)の場合には、予め反応活性基を導入したオリゴヌクレオチドを合成し、これらを表面処理した固相担体表面にスポット装置を用いて点着し、共有結合を介して固定させる(「蛋白質・核酸・酵素」、43、2004-2011(1998); Lamture, J.B. et al., Nucl. Acids Res., 22, 2121-2125(1994); 及び Guo, Z. et al., Nucl. Acids Res., 22, 5456-5465(1994))。オリゴヌクレオチドに導入する反応活性基としては、アミノ基、アルデヒド基、SH基、ビオチンなどが用いられる。固相担体の表面処理には、アミノ基、アルデヒド基、エポキシ基等を有する各種のシランカップリング剤が用いられる。この共有結合による場合には、(1)の静電結合による場合に比べて、プローブを固相担体表面に安定に固定することができる。

20

【0012】

DNA等の核酸の検出に際しては、まず固相担体表面に高密度に整列したDNA断片などのプローブに対して、ラジオアイソトープ(RI)や蛍光で標識した核酸断片試料(ターゲット核酸資料)をハイブリダイズさせる。このとき、ターゲット核酸中の、プローブと相補的な塩基配列をもつ分子は、プローブと相補的に結合(ハイブリダイズ)する。次いで、このハイブリダイズしている標識したターゲット分子のシグナルを測定し、ハイブリダイズされたプローブ分子を同定する。具体的には、RIや蛍光イメージスキャナーでマイクロアレイ上の放射線強度または蛍光強度を測定し、そして得られた画像データを解析処理する。従って、DNAマイクロアレイによれば、数千乃至数万個の分子を同時にハイブリダイズさせて検出することができ、微量の試料で短時間のうちに大量の遺伝子情報を得ることができる。

30

【0013】

試料としては、遺伝子発現解析の場合、Poly(A)+RNAあるいはTotal RNAのいずれかが、遺伝子多型解析等の場合、ゲノム核酸が使用される。しかしながら、試料が少量であるほど蛍光強度が減弱しデータの信頼度が低下する。そのため、「Gene Chip」等においては、RNA等の発現頻度分布を変えことなく、試料を増幅する手法がしばしば用いられる。これは、試料RNA(もしくはゲノムDNA)から、T7プロモーター等のプロモーター配列を有するオリゴを用いてcDNAを合成し、RNAポリメラーゼにより、cRNAを合成する方法である。RNAを合成する過程で試料核酸は約100倍に増幅される。さらに、「Gene Chip」の場合、cRNAの立体構造を破壊するため、断片化が行われる。蛍光検出に関しては、RNAの合成過程でビオチン標識dNTP体が取りこまれ、これに対してアビジン-フィコエリスリンが結合し、蛍光検出される。

40

【0014】

このようなRNAをDNAに変換し、さらにRNAに増幅するような実験系においては、その過程の間にしばしば試料を精製する工程が含まれる。アレイの実験においては、精度の高いデータを得るために、サンプルは高度に精製されていることが必須である。精製

50

過程におけるメカニズムは抽出工程と同じであるため、前述したのと抽出時と同様の課題（高純度核酸を迅速、簡便、かつ自動化できる方法）を有している。

【特許文献1】特公平7-51065号公報

【特許文献2】米国特許第5202231号公報

【特許文献3】米国特許第5700637号

【非特許文献1】Fodor, S.P.A. et al, Science, 251, 767-773(1991)

【非特許文献2】Schena, M et al, Science, 270, 467-470(1995)

【非特許文献3】「蛋白質・核酸・酵素」、43、2004-2011(1998)

【非特許文献4】Lamture, J.B. et al., Nucl. Acids Res., 22, 2121-2125(1994)

【非特許文献5】Guo, Z. et al., Nucl. Acids Res., 22, 5456-5465(1994)

10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

本発明の目的は、アレイ法において核酸解析を高精度に円滑に進めるために、高純度で、迅速、簡便、かつ自動化できる抽出方法を提供することにある。同時に、アレイ法に用いるサンプルを調製する時に、高純度で、迅速、簡便、かつ自動化できる方法で核酸を精製することにある。

【課題を解決するための手段】

【0016】

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、核酸を多孔膜に吸着及び脱着させる過程を含む核酸の分離精製方法において、所定の条件で、二個の開口を有する容器内に核酸吸着性多孔膜を収容した核酸分離精製力-トリッジを使用することによって、迅速、簡便に核酸を含む検体から核酸を分離することができることを見出した。また、この方法が、アレイ法のサンプルの調製時における精製にも利用できることを併せて見出した。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。

20

【0017】

即ち、本発明によれば、従来法にはない迅速さと簡便さを併せ持つ、核酸の分離精製方法が提供され、アレイ法等の解析に利用される。

【0018】

本発明によれば、(a)核酸を含む試料溶液を、少なくとも二個の開口を有する容器内に、圧力差により溶液が通過可能な、核酸吸着性固相を収容した核酸分離精製力-トリッジの一の開口に注入する工程、(b)核酸分離精製力-トリッジの上記一の開口に結合された圧力差発生装置を用いて核酸分離精製力-トリッジ内を加圧状態にし、注入した核酸を含む試料溶液を、核酸吸着性多孔膜を通過させ、核酸分離精製力-トリッジの他の開口より排出することによって、核酸吸着性多孔膜内に核酸を吸着させる工程、(c)核酸分離精製力-トリッジの上記一の開口に洗浄液を注入する工程 (d)核酸分離精製力-トリッジの上記一の開口に結合された圧力差発生装置を用いて核酸分離精製力-トリッジ内を加圧状態にし、注入した洗浄液を、核酸吸着性多孔膜を通過させ、他の開口より排出することによって、核酸吸着性多孔膜を、核酸が吸着した状態で、洗浄する工程、(e)核酸分離精製力-トリッジの上記一の開口に回収液を注入する工程 (f)核酸分離精製力-トリッジの上記一の開口に結合された圧力差発生装置を用いて核酸分離精製力-トリッジ内を加圧状態にし、注入した回収液を、核酸吸着性多孔膜を通過させ、他の開口より排出することによって、核酸吸着性多孔膜内から核酸を脱着させ、核酸分離精製力-トリッジ容器外に排出する工程、を含む分離精製方法によって分離精製した核酸をアレイ法で解析することを特徴とする解析方法が提供される。

30

40

【0019】

好ましくは、分離精製した核酸を核酸標識体とし、この核酸標識体を上記の核酸分離精製法で精製した後、アレイ法で解析する。好ましくは、核酸はDNAであり、PCR法、ランダムプライム法を用いて標識したDNAをアレイ法で解析する。好ましくは、PCR法、ランダムプライム法を用いて標識したDNAを上記の核酸分離方法で精製したDNA

50

をアレイ法で解析する。好ましくは、核酸はDNAであり、PCR法、ランダムプライム法を用いてDNAを合成し、次いでインビトロトランスレーションにより標識したRNAを合成し、該RNAをアレイ法で解析する。好ましくは、PCR法、ランダムプライム法を用いて合成したDNAを上記の核酸分離方法で精製するか、及び/又はインビトロトランスレーションにより標識したRNAを上記の核酸分離方法で精製する。好ましくは、解析は、核酸配列の読み取り、又は一塩基多型の解析である。

【0020】

好ましくは、核酸はRNAであり、逆転写反応法あるいは逆転写反応とPCR法を用いて標識したDNAをアレイ法で解析する。好ましくは、核酸はRNAであり、逆転写反応法あるいは逆転写反応とPCR法を用いて標識したDNAを上記の核酸分離方法で精製したDNAをアレイ法で解析する。好ましくは、核酸はRNAであり、逆転写反応法あるいは逆転写反応とPCR法を用いてDNAを作成し、インビトロトランスレーションで標識したRNAをアレイ法で解析する。好ましくは、逆転写反応法あるいは逆転写反応とPCR法を用いて作成したDNAを上記の核酸分離方法で精製するか、及び/又は、インビトロトランスレーションで標識したRNAを上記の核酸分離方法で精製する。好ましくは、解析は遺伝子発現解析である。

10

【0021】

好ましくは、核酸吸着性固相は、イオン結合が関与しない弱い相互作用で核酸が吸着することのできる有機高分子である。好ましくは、核酸吸着性固相は、水酸基を有する有機高分子からなる多孔膜である。好ましくは、水酸基を有する有機高分子からなる多孔膜は、アセチルセロースの多孔膜を鹼化処理した多孔膜である。好ましくは、水酸基を有する有機高分子からなる多孔膜はトリアセチルセロースの多孔膜を鹼化処理した多孔膜である。好ましくは、多孔膜は平均孔径0.1~10.0 μ mの多孔膜である。好ましくは、多孔膜は厚さ50~500 μ mの多孔膜である。

20

【0022】

好ましくは、核酸を含む試料溶液は、核酸の水溶液または核酸のバッファ溶液に水溶性有機溶媒を添加した溶液である。好ましくは、核酸を含む試料溶液は、細胞又はウイルスを含む検体を核酸可溶化試薬で処理して得られた溶液に水溶性有機溶媒を添加した溶液である。好ましくは、水溶性有機溶媒は、メタノール、エタノール、イソプロパノール又はn-プロパノールである。好ましくは、核酸可溶化試薬は、グアニジン塩、および界面活性剤を含む溶液である。好ましくは、洗浄液は、メタノール、エタノール、イソプロパノール又はn-プロパノールを20~100重量%含む溶液である。好ましくは、回収液は、塩濃度が0.5M以下の溶液である。好ましくは、圧力発生装置は、核酸分離精製カートリッジの一の開口に着脱可能に結合されるポンプである。

30

【0023】

本発明の別の側面によれば、上記した核酸分離精製工程に続いてアレイ法による核酸の検出を行うための装置が提供される。本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明の核酸分離精製工程に続いてアレイ法による核酸の検出を行うための試薬キットが提供される。

【発明の効果】

40

【0024】

マイクロアレイ法に用いられるサンプルの調製において、煩雑で時間がかかっていたことが、本発明の核酸の分離精製方法により、分離性能良く、簡便で、迅速に、自動化可能に、核酸を含む検体から核酸を分離精製することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0025】

以下、本発明の実施の形態について説明する。

【0026】

本発明における核酸の分離精製方法は、核酸を含む検体から核酸を分離精製する方法に関するものであり、核酸吸着性多孔膜に核酸を吸着及び脱着させる工程を含むことを特徴

50

とする。

【0027】

本発明において「核酸」は一本鎖、二本鎖のいずれでもよく、DNA、RNAのいずれでもよく、また、分子量の制限も無い。

【0028】

核酸を含む検体は、単一の核酸を含む検体でもよいし、異なる複数種類の核酸を含む検体でもよい。核酸の長さも特に限定されず、例えば、数bp～数Mbpの任意の長さの核酸を使用することができる。取り扱い上の観点からは、核酸の長さは一般的には、数bp～数百kbp程度である。

【0029】

少なくとも2個の開口を有する核酸分離精製力-トリッジに、核酸吸着性多孔膜を収容した核酸分離精製力-トリッジと、核酸分離精製力-トリッジの少なくとも2つの開口の間に圧力差を発生させる装置を用いて、核酸の吸着及び脱着を行う場合、核酸の分離精製方法について以下に具体的に説明する。本発明では、好ましくは、核酸を含む試料溶液を、核酸吸着性多孔膜中を通過させることにより試料溶液中の核酸を多孔膜に吸着させ、次いで、多孔膜に吸着させた核酸を、最適な溶液を用いて膜から脱着させる。

【0030】

本発明において使用できる核酸を含む試料溶液に制限はないが、例えば診断分野においては、検体として採取された全血、血漿、血清、尿、便、精液、唾液等の体液、あるいは植物（又はその一部）、動物（またはその一部）など、あるいはそれらの溶解物およびホモジネートなどの生物材料から調製された溶液が対象となる。

【0031】

最初にこれらの検体を、細胞膜を溶解して核酸を可溶化する試薬を含む水溶液で処理する。これにより細胞膜および核膜が溶解されて、核酸が水溶液内に分散する。

【0032】

細胞膜の溶解および核酸の可溶化のためには、例えば、対象となる試料が全血の場合、（1）赤血球の除去、（2）各種タンパク質の除去、及び（3）白血球の溶解及び核膜の溶解が必要となる。（1）赤血球の除去および（2）各種タンパク質の除去は、膜への非特異吸着および多孔膜の目詰まりを防ぐために、（3）白血球の溶解及び核膜の溶解は、抽出の対象である核酸を可溶化させるためにそれぞれ必要となる。特に、（3）白血球の溶解及び核膜の溶解は重要な工程であり、本発明の方法では、この工程で核酸を可溶化することが必要である。

【0033】

本発明で用いる核酸可溶化試薬としては、グアニジン塩、界面活性剤およびタンパク質分解酵素を含む溶液が挙げられる。

グアニジン塩としては、塩酸グアニジンが好ましいが、他のグアニジン塩（イソチオシアン酸グアニジン、チオシアン酸グアニジン）を使用することもできる。グアニジン塩の溶液中の濃度は、0.5M以上6M以下 好ましくは 1M以上5M以下である。

【0034】

界面活性剤としてはTriton-X100を使用することができるが、この他にも、SDS、コール酸ナトリウム又はサルコシンナトリウム等の陰イオン性界面活性剤、Tween20又はメガファック等のノニオン性界面活性剤、その他各種両性界面活性剤を使用することもできる。本発明では、ポリオキシエチレンオキチルフェニルエーテル（Triton-X100）等のノニオン性界面活性剤を使用することが好ましい。界面活性剤の溶液中の濃度は、通常0.05重量%～10重量% 特に好ましくは0.1重量%～5重量%である。

【0035】

核酸可溶化試薬にタンパク質分解酵素を用いる場合は、プロテアーゼKを使用することはできるが、他のプロテアーゼでも同様の効果を得ることができる。プロテアーゼは酵素であるため加温するのが好ましく、37℃～70℃で使用することが好ましく、特に50

10

20

30

40

50

℃～65℃で使用する事が好ましい。

【0036】

このように核酸が分散した水溶液中に、水溶性有機溶媒を添加して、核酸吸着性多孔膜内を一方の面から他方の面へと通過させる。この操作により、試料溶液中の核酸が核酸吸着性多孔膜に吸着される。本明細書中上記した操作で可溶化された核酸を、核酸吸着性多孔膜に吸着させるためには、可溶化した核酸混合液に水溶性有機溶媒を混合することと、得られた核酸混合液中に塩が存在することが必要である。

【0037】

ここで用いる水溶性有機溶媒としては、エタノール、イソプロパノール又はプロパノールなどが挙げられ、中でもエタノールが好ましい。水溶性有機溶媒の濃度は、好ましくは5重量%～90重量%であり、さらに好ましくは20重量%～60重量%である。エタノールの添加濃度は、凝集物を生じない程度でできるだけ高くすることが特に好ましい。

10

【0038】

得られた核酸混合液中に存在する塩としては、各種カオトロピック物質（グアニジウム塩、ヨウ化ナトリウム、過塩素酸ナトリウム）や塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化アンモニウム、臭化ナトリウム、臭化カリウム、臭化カルシウム、臭化アンモニウム等が好ましい。特にグアニジウム塩は、細胞膜の溶解および核酸の可溶化の効果を併有するので特に好ましい。

【0039】

次いで、この核酸が吸着した核酸吸着性多孔膜内に洗浄液を通過させる。この溶液は核酸と一緒に核酸吸着性多孔膜に吸着した試料溶液中の不純物を洗い流す機能を有する。従って、核酸吸着性多孔膜から核酸は脱着させないが不純物は脱着させる組成を有する必要がある。洗浄液は主剤と緩衝剤からなる。主剤としてはメタノール、エタノール、イソプロパノール、*n*-イソプロパノール、ブタノール、アセトン等の約10～100重量%（好ましくは約20～100重量%、さらに好ましくは約40～80重量%）の水溶液である。

20

【0040】

次に、回収液を、上記洗浄後の核酸吸着性多孔膜内を通過させる。核酸吸着性多孔膜を通過した、この溶液には目的とする核酸が含まれているので、これを回収し、後に続く操作、例えばPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）による核酸の増幅に提供する。核酸を脱着せしめうる溶液としては、塩濃度が低いことが好ましく、特に好ましくは0.5M以下の塩濃度の溶液を使用する。この溶液としては、精製蒸留水、TEバッファ等が使用できる。

30

【0041】

本発明で使用する核酸分離精製力-トリッジは、少なくとも2個の開口を有する容器内に核酸吸着性多孔膜を有する膜を収容した核酸分離精製力-トリッジである。

【0042】

容器の材料に特別な限定はなく、核酸吸着性多孔膜が収容でき、かつ少なくとも2個の開口を設けることができればよいが、製造の容易性からプラスチックが好ましい。例えば、ポリスチレン、ポリメタアクリル酸エステル、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリエステル、ナイロン、ポリカーボネート等の透明あるいは不透明の樹脂を用いるのが好ましい。

40

【0043】

上記力-トリッジに収容される核酸吸着性多孔膜の形状にも特別な限定は無く、円形、正方形、長方形、楕円等、任意の形状で良いが、製造適性の点からは、円が好ましい。

【0044】

圧力差発生装置としては、注射器、ピペッタ、あるいはペリスタポンプのような加圧が可能なポンプ等が挙げられる。これらの内、手動操作には注射器が、自動操作にはポンプが適している。また、ピペッタは片手操作が容易にできるという利点を有する。好ましくは、圧力差発生装置は、前記容器の一の開口に着脱可能に結合されている。

【0045】

50

本発明で用いられるアレイ法について詳細に説明する。本発明で用いられるアレイは、通常、マイクロアレイと称される Affymetrix 社の「GeneChip」はもちろんのこと、Agilent 社、Takara 社、日立ソフト社等の市販のマイクロアレイも用いる事が出来る。また、松浪ガラス社、旭テクノグラス社等で市販されているスライドガラスを購入し、Cartesian 社等から市販されているスポットターを用いて、自ら作成してもよい。また、マイクロアレイと呼ばれる多孔膜に DNA がスポットされているものを用いることも可能である。これらは、例えば、clonetechnology 社等より購入することが出来る。

【0046】

アレイ法におけるサンプル調製時に用いられる手法としては、試料が RNA の場合、RNA から逆転写反応 (RT 反応) により cDNA を合成する方法はもちろんのこと、さらにサンプルを増幅するために、あらかじめ T7 等のプロモーター配列を有するプライマーで逆転写反応を行って cDNA を合成しておき、in vitro transcription 法を用いて cRNA を合成する方法を用いることも出来る。この時、T7 プロモーター以外にも T3 や SP6 プロモーターを利用して in vitro transcription 法を行うことももちろん可能である。

【0047】

また、試料が DNA の場合は、PCR 法を用いて、ゲノム DNA の特定領域を増幅することが出来る。これ以外にも、ランダムプライマーを用いて不特定領域を増幅する方法等を用いることが出来る。

【0048】

試料が RNA、DNA に関わらず、上記のどのサンプル調製法を行ったとしても、本発明における核酸の分離精製方法は好ましく用いることができる。

【0049】

アレイ法においては、蛍光色素等の被検出体をサンプル核酸に標識している。この標識方法としては、あらかじめ被検出体が標識されたプライマーを用いて前記の PCR 反応や RT 反応を行わせたり、標識された dNTP 体を PCR 反応や RT 反応時に取り込ませる方法等用いる事が出来る。

【0050】

これらの被検出体を標識する場合、反応後に未反応の被検出体を除去することが必要となるが、この除去にも本発明の核酸分離方法を用いる事ができる。

【0051】

標識法としては、上記以外にも、例えばビオチン標識された dNTP 体やプライマーを用いて、PCR 反応や RT 反応を行わせて、ハイブリ反応後にアビジン標識された検出体を結合させる方法も知られている。

【実施例】

【0052】

実施例 1 核酸吸着性多孔膜を用いた RNA 抽出

(1) 核酸精製カートリッジの作成

内径 7 mm、核酸吸着性多孔膜を収容する部分を持つ核酸精製カートリッジをハイインパクトポリスチレンで作成する。核酸吸着性多孔膜として、トリアセチルセルロースの多孔膜を使用し、上記 (1) で作成した核酸精製カートリッジの核酸吸着性多孔膜収納部に収容する。

【0053】

(2) 核酸可溶化試薬溶液及び洗浄液の調製

表 1 に示す処方の核酸可溶化試薬溶液及び洗浄液を調製する。

【0054】

(表 1)

(核酸可溶化試薬溶液)

塩酸グアニジン (Invitrogen 社製) 382 g

10

20

30

40

50

Tris (Invitrogen社製)	12.1g
Triton-X100 (ICN社製)	10g
蒸留水	1000ml
(洗浄液)	
10mM Tris-HCl	65%エタノール

【0055】

(3) 核酸精製操作

急性骨髄性白血病患者由来の細胞 (HL60) 培養液を用意する。この培養液 200 μ l に核酸可溶化試薬溶液 200 μ l を添加して 60℃ で 10 分間インキュベートする。インキュベート後、エタノール 200 μ l を加え、攪拌する。攪拌後、上記 (1) 及び (2) で作成した核酸吸着性多孔膜を有する核酸精製カートリッジの開口に注入し、続いて上記の開口に圧力差発生装置を結合し、核酸分離精製力 - トリッジ内を加圧状態にし、注入した核酸を含む試料溶液を、核酸吸着性多孔膜に通過させることで、核酸吸着性多孔膜に接触させ、核酸分離精製力 - トリッジの他の開口より排出する。続いて、上記核酸分離精製力 - トリッジの上記の開口に洗浄液を注入し、上記の開口に圧力差発生装置を結合し、核酸分離精製力 - トリッジ内を加圧状態にし、注入した洗浄液を、核酸吸着性多孔膜に通過させ、他の開口より排出する。続いて、上記核酸分離精製力 - トリッジの上記の開口に回収液を注入し、核酸分離精製力 - トリッジの上記の開口に圧力差発生装置を結合して核酸分離精製力 - トリッジ内を加圧状態にし、注入した回収液を、核酸吸着性多孔膜に通過させ、他の開口より排出し、この液を回収する。核酸を含む試料溶液をカートリッジに注入してから回収するまでの操作時間は、約 2 分である。

【0056】

実施例 2 GeneChip による遺伝子発現解析

(1) DNAチップ用の cDNA 合成

実施例 1 により抽出してきた全 RNA 2~5 μ g から、T7-(dT)24 (Amersham Pharmacia Biotech) をプライマーとして、Affymetrix 社の Expression Analysis Technical Manual の方法に従い Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen 社) を用いて逆転写し 1 本鎖 cDNA を作製する。T7-(dT)24 プライマーは、以下のように T7 プロモーターの塩基配列に d(T)24 を付加した塩基配列からなる。

T7-(dT)24 プライマー: 5'-GGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGGCGG-(dT)24-3' (配列番号: 1)

【0057】

次に、Expression Analysis Technical Manual に従い、DNA Ligase、DNA polymerase I、および RNase H を加え、2 本鎖 cDNA を合成する。cDNA を実施例 1 記載の核酸吸着多孔質膜を用いる方法で精製する。(約 2 分) さらに、BioArray High Yield RNA Transcription Labeling Kit を用い、ビオチンラベルした cRNA を合成する。再び実施例 1 記載の方法を用いて cRNA を精製し (約 2 分)、熱処理により断片化する。そのうち 12.5 μ g の cRNA を Expression Analysis Technical Manual に従い Hybridization Cocktail に加える。これをアレイに入れ、45℃ で 16 時間ハイブリダイゼーションする。DNA チップとしては GeneChip Human Genome-U133 (Affymetrix 社製) を用いる。DNA チップを洗浄した後、Streptavidin Phycoerythrin を加え染色した洗浄後、スキャナーにセットし、DNA チップ解析ソフトにて解析する。

【0058】

(2) DNAチップ解析

DNA チップ解析ソフトである Array Gauge (富士写真フイルム社製) を用いて発現蛍光強度を測定し、データ解析を行う。まず全てのチップについて Absolute analysis を行い、用いたサンプル各々の遺伝子発現量を測定する。1 個のチップデータの解析は、プローブセットのパーフェクトマッチとミスマッチの蛍光強度を比較して、positive と negative を決定する。 β -Actin と GAPDH の 2 遺伝子の蛍光強度を測定した結果、ともに positive の結果である。

10

20

30

40

50

【0059】

比較例1 kitによるRNA抽出

全RNA抽出は、RNA抽出キットISOGEN (ニッポンジーン社)を用いてその説明書に従って行う。急性骨髄性白血病患者由来の細胞 (HL60) 培養液を用意する。培養後の細胞を3 mLのIsogen (4M guanidium thiocyanate, 25mM sodium cyanate, 0.5% Sarcosyl, 0.1M β -メルカプトエタノール, pH7.0) に溶解させる。室温で5分間静置させ、 CHCl_3 を0.6 mL (Isogenの1/5量) 加えて、ミキサーで15秒間混合させた後、再び室温で2~3分間静置させる。4°Cで15,000 rpm 15分間遠心を行う。上清を新しいチューブに移し、Et hachinnate (ニッポンジーン) 3 μ L、イソプロパノール1.5 mL (Isogenの1/2量) を加え、転倒混和して室温に10分間静置させる。4°Cで15,000rpm 15分間遠心を行い、沈殿物に75%エタノール3 mL (Isogenの等量) を加え、15,000 rpm 4°Cで5分間遠心する。沈殿物を風乾もしくは2~3分間真空乾燥させる。RNase-free DWを10 μ L加えてRNA溶液とする。この間の操作時間は、約1.5時間である。

10

【0060】

比較例2 GeneChipによる遺伝子発現解析

比較例1より抽出してきたTotal RNAを用いて、実施例2と同じくGeneChipを用いて遺伝子発現解析を行う。このとき、比較のため2本鎖cDNAの精製には、MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN社: 約15分)、cRNAの精製には、RNeasy Mini Kit (QIAGEN社: 約15分) を用いる。実施例2と同様のプローブセットのパーフェクトマッチとミスマッチの蛍光強度を比較して、positiveとnegativeを決定する。 β -ActinとGAPDHの2遺伝子の蛍光強度を測定した結果、ともにpositiveの結果である。

20

【0061】

実施例と比較例から明らかなように、本発明用の方法を用いることにより、核酸抽出段階において、約1.5時間、アレイ解析において約20分、測定時間を短縮できる。これより、本発明の方法を用いることにより、RNA試料を迅速に、かつ簡便に回収及び精製でき、また、マイクロアレイ解析時間も短縮できることが分かる。

【0062】

実施例3 核酸吸着性多孔膜を用いたゲノムDNA抽出

(1) 核酸精製カートリッジの作成

30

内径7 mm、核酸吸着性多孔膜を収容する部分を持つ核酸精製カートリッジをハイインパクトポリスチレンで作成する。核酸吸着性多孔膜として、トリアセチルセルロースの多孔膜を酸処理した多孔膜を使用し、上記(1)で作成した核酸精製カートリッジの核酸吸着性多孔膜収納部に収容する。

【0063】

(2) 核酸可溶化試薬溶液及び洗浄液の調製

表2に示す処方 of 核酸可溶化試薬溶液及び洗浄液を調製する。

【0064】

(表2)

(核酸可溶化試薬溶液)

40

塩酸グアニジン (インビトロジェン社製)	382 g
Tris (インビトロジェン社製)	12.1 g
Triton-X100 (ICN製)	10 g
蒸留水	1000 ml

(洗浄液)

10 mM Tris-HCl	65 % エタノール
----------------	------------

【0065】

(3) 核酸精製操作

ALDH2 活性型またはALDH2 不活性型それぞれのヒト全血試料を準備する。この全血試料200 μ lに核酸可溶化試薬溶液200 μ lとプロテアーゼK (SIGMA製)

50

溶液 20 μ l を添加して 60 $^{\circ}$ C で 10 分間 インキュベートする。インキュベート後、エタノール 200 μ l を加え、攪拌する。攪拌後、上記 (1) 及び (2) で作成した核酸吸着性多孔膜を有する核酸精製カートリッジの一の開口に注入し、続いて上記一の開口に圧力差発生装置を結合し、核酸分離精製力 - トリッジ内を加圧状態にし、注入した核酸を含む試料溶液を、核酸吸着性多孔膜に通過させることで、核酸吸着性多孔膜に接触させ、核酸分離精製力 - トリッジの他の開口より排出する。続いて、上記核酸分離精製力 - トリッジの上記一の開口に洗浄液を注入し、上記一の開口に圧力差発生装置を結合し、核酸分離精製力 - トリッジ内を加圧状態にし、注入した洗浄液を、核酸吸着性多孔膜に通過させ、他の開口より排出する。続いて、上記核酸分離精製力 - トリッジの上記一の開口に回収液を注入し、核酸分離精製力 - トリッジの上記一の開口に圧力差発生装置を結合して核酸分離精製力 - トリッジ内を加圧状態にし、注入した回収液を、核酸吸着性多孔膜に通過させ、他の開口より排出し、この液を回収する。核酸を含む試料溶液をカートリッジに注入してから回収するまでの操作時間は、約 2 分である。

10

【0066】

実施例 4 マイクロアレイ法を用いた SNP 検出

(1) DNA チップの作製

2 重量 % アミノプロピルエトキシシラン (信越化学工業 (株) 製) のエタノール溶液に、スライドガラス (25 mm \times 75 mm) を 10 分間浸した後取り出し、エタノールで洗浄後、110 $^{\circ}$ C で 10 分間乾燥して、シラン化合物被覆スライドを作成した。次いで、このシラン化合物被覆スライドを、5 重量 % 1, 2 - ビス (ビニルスルホニルアセトアミド) エタンのリン酸緩衝液 (pH 8.5) 溶液に 1 時間浸した後取り出し、アセトニトリルで洗浄し、1 時間減圧下にて乾燥し、ビニルスルホニル基が導入されたスライドを得る。ALDH2 をコードする遺伝子の SNP (Glu487Lys) を中央に含む以下に示す配列を有する 5' 末端にアミノ基が結合した 2 種類のオリゴ DNA 断片 (Simgenosys 社製) を滅菌水に分散する。

20

【0067】

正常型) 5' (NH₂) - caggcat acact gaagt gaaaact g - 3' (配列番号 2)

変異型) 5' (NH₂) - caggcat acact gaagt gaaaact g - 3' (配列番号 3)

【0068】

その水溶液 (1 \times 10⁻⁵ M) を上記のスライドに市販のスプッター (SP-BIO: 日立ソフト社製) を用いて点着した。そのスライドを、25 $^{\circ}$ C、湿度 70 % にて一晩放置した後、4 \times SSC (SSC: 標準食塩 - クエン酸緩衝液) 水溶液で 5 分間洗浄し、さらに 0.5 M グリシン水溶液 (pH 8.5) で 1 時間洗浄した。次いで、そのスライドを滅菌水で 3 分間洗浄し、余分なオリゴ DNA 断片を除去した。そして、スライドを室温で乾燥させて、ALDH2 の SNP が測定可能な DNA マイクロアレイを得る。

30

【0069】

(2) DNA 試料液の調製

実施例 3 の方法で、ALDH2 活性型または ALDH2 不活性型それぞれのヒト全血試料から抽出・精製して得たタ - ゲット核酸断片を含む核酸試料液をそのまま用いて、以下の条件で PCR 増幅を行う。なお、upper 側のプライマーの 5' 末端に蛍光標識試薬 (FluoroLink Cy5、アマシャム・ファルマシア・バイオテック社製) が結合している。

40

【0070】

<プライマー>

upper: 5' (Cy5) - attacagggt caact gct atg - 3' (配列番号 4)

lower: 5' - aggt cct gaact tccagcag - 3' (配列番号 5)

【0071】

以下に示す反応液の組成で、[変性: 94 $^{\circ}$ C \cdot 20 秒、アニーリング: 60 $^{\circ}$ C \cdot 30 秒、ポリメラーゼ伸長反応: 72 $^{\circ}$ C \cdot 1 分] を 35 サイクル繰り返すことで PCR 増幅反応を実施する。

50

【 0 0 7 2 】

< 反応液の組成 >

1 0 × P C R バッファ -	5 μ L
2 . 5 m M d N T P	5 μ L
5 μ M プライマ - (upper)	2 μ L
5 μ M プライマ - (lower)	2 μ L
T a q	0 . 5 μ L
実施例 3 で得た核酸試料液 (1 0 0 n g / μ L)	0 . 5 μ L
精製水	3 5 μ L

【 0 0 7 3 】

P C R 反応後、実施例 3 記載の方法を用いて D N A の増幅断片の精製を行う。この所要時間は、約 2 分である。

【 0 0 7 4 】

(2) 試料 D N A 断片の検出

上記 (1) の D N A マイクロアレイ上に、上記 (2) で得た D N A 断片を含むハイブリダイゼーション用溶液 (4 × S S C 溶液と 0 . 2 重量 % ドデシル硫酸ナトリウム (S D S) 水溶液の混合溶液) 5 0 μ L を点着する。試料である D N A 断片は、A L D H 2 活性型または A L D H 2 不活性型それぞれのヒト由来のものを用いる。点着後の D N A マイクロアレイの表面を顕微鏡用カバーガラスで覆い、モイスチャーチャンバ内にて 6 0 ° C で 2 時間インキュベートし、室温にて 0 . 1 重量 % S D S 水溶液と 2 × S S C 水溶液との混合溶液で、5 0 ° C にて 0 . 1 重量 % S D S 水溶液と 0 . 2 × S S C 水溶液との混合溶液で、および室温にて 0 . 2 × S S C の水溶液で順次洗浄した後、6 0 0 r p m で 2 0 秒間遠心し、室温で乾燥する。乾燥後の D N A マイクロアレイの表面の蛍光強度を測定し、D N A マイクロアレイ上の正常型オリゴに由来するスポットの蛍光強度と変異型のオリゴに由来するスポットの蛍光強度を測定し比較する。結果は、表 3 に示す通りである。

【 0 0 7 5 】

(表 3)

	正常型スポット	変異型スポット
A L D H 2 活性型試料	3850	150
A L D H 2 不活性型試料	200	4030

【 0 0 7 6 】

表 3 の結果より、本発明における核酸の分離精製方法を用いてアレイ法により、正しく S N P 解析が出来ることがわかる。しかも、この方法は、従来の方法に比べて、核酸を含む試料から核酸を抽出する工程が約 2 分と、迅速に行える点とサンプル調製時の精製も同様に迅速に行える点で優れている。

【 配列表 】

2005095003000001. app

【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成 16 年 12 月 1 日 (2004. 12. 1)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 0 0 3 4

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 0 0 3 4 】

界面活性剤としては T r i t o n X - 1 0 0 を使用することができるが、この他にも、S D S、コール酸ナトリウム又はサルコシンナトリウム等の陰イオン性界面活性剤、T w e e n 2 0 又はメガファック等のノニオン性界面活性剤、その他各種両性界面活性剤を使用することもできる。本発明では、ポリオキシエチレンオキチルフェニルエーテル (T r i t o n X - 1 0 0) 等のノニオン性界面活性剤を使用することが好ましい。界面活性剤

10

20

30

の溶液中の濃度は、通常 0 . 0 5 重量 % ~ 1 0 重量 % 特に好ましくは 0 . 1 重量 % ~ 5 重量 % である。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 5 4

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 5 4】

(表 1)

(核酸可溶化試薬溶液)

塩酸グアニジン (I n v i t r o g e n 社 製)	3 8 2 g
T r i s (I n v i t r o g e n 社 製)	1 2 . 1 g
T r i t o n X - 1 0 0 (I C N 社 製)	1 0 g
蒸留水	1 0 0 0 m l

(洗浄液)

1 0 m M	T r i s - H C l	6 5 % エタノール
---------	-----------------	-------------

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 6 4

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 6 4】

(表 2)

(核酸可溶化試薬溶液)

塩酸グアニジン (インビトロジェン 社 製)	3 8 2 g
T r i s (インビトロジェン 社 製)	1 2 . 1 g
T r i t o n X - 1 0 0 (I C N 製)	1 0 g
蒸留水	1 0 0 0 m l

(洗浄液)

1 0 m M	T r i s - H C l	6 5 % エタノール
---------	-----------------	-------------

フロントページの続き

- (72) 発明者 駒澤 宏幸
埼玉県朝霞市泉水 3 - 1 1 - 4 6 富士写真フイルム株式会社内
- (72) 発明者 岩木 義英
埼玉県朝霞市泉水 3 - 1 1 - 4 6 富士写真フイルム株式会社内
- (72) 発明者 牧野 快彦
埼玉県朝霞市泉水 3 - 1 1 - 4 6 富士写真フイルム株式会社内
- (72) 発明者 天野 芳和
埼玉県朝霞市泉水 3 - 1 1 - 4 6 富士写真フイルム株式会社内
- F ターム(参考) 4B024 AA11 CA01 HA19
4B029 AA07 AA23 FA12
4B063 QA12 QA13 QQ13 QR32 QR55 QS25 QS34